

文章编号:1005-6947(2006)07-0525-04

· 基础研究 ·

Ang2, HIF-1 α 及 VEGF 对肝癌血管形成的影响

袁玉峰, 刘志苏, 何跃明, 钱群, 汪必成, 江从庆, 吴云华, 艾中立

(武汉大学中南医院 普通外科, 湖北 武汉 430071)

摘要: **目的** 探讨促血管生成素 2 (Ang2)、缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 与肝细胞癌血管形成的关系。**方法** 检测 52 例肝癌组织中 Ang2, HIF-1 α 及 VEGF mRNA 及蛋白的表达, 对共表达的肝癌组织进行微血管计数。**结果** RT-PCR 显示, 52 例肝癌组织中有 38 例共表达 Ang2 mRNA, HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA, 且两两之间呈明显正相关 (分别为 $r = 0.783, P < 0.01$; $r = 0.427, P < 0.05$; $r = 0.433, P < 0.05$); 免疫组化发现, 52 例肝癌组织 36 例共表达 Ang2, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白。共表达 Ang2 mRNA, HIF-1 α mRNA 和 VEGF 蛋白的 38 例肝癌组织中, 平均微血管数 $[(45.4 \pm 8.90) \text{ 个/HP}]$, 明显高于非共表达组 $[(13.6 \pm 3.30) \text{ 个/HP}]$ ($P < 0.05$)。**结论** Ang2, HIF-1 α 和 VEGF 与肝癌的新生血管形成有关; 肿瘤组织缺氧可能是其始动因素。

关键词: 肝细胞癌/病理学; 促血管生成素; 缺氧诱导因子; 血管生长因子

中图分类号: R730.261

文献标识码: A

Effect of angiopoietin2, hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in human hepatocellular carcinoma

YUAN Yu-feng, LIU Zhi-su, HE Yue-ming, QIAN Qun, WANG Bicheng,
JIANG Cong-qing, WU Yun-hua, AI Zhong-li

(Department of General Surgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between hypoxia inducible factor-1 α , angiopoietin2 and vascular endothelial growth factor and angiogenesis in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression of hypoxia inducible factor-1 α , angiopoietin2 and vascular endothelial growth factor mRNA was detected in 52 HCC surgical specimens. And microvessel density (MVD) in tissue specimens of patients with coexpression of the parameters was examined. **Results** Of the 52 surgical specimens, 36 cases had over expression of HIF- α , angiopoietin and VEGF protein, and coexpression of HIF- α and angiopoietin and VEGF mRNA in 38 of 52 cases. The expression of HIF- α , angiopoietin was related with the expression of VEGF ($r_1 = 0.783, P < 0.01, r_2 = 0.427, P < 0.05, r_3 = 0.433, P < 0.05$). In the cases of over expression of HIF- α , angiopoietin and VEGF protein and mRNA, the average MVD was $[(45.4 \pm 8.90) / \text{HP}]$ significantly higher than that of cases with non coexpression group $[(13.6 \pm 3.30) / \text{HP}]$ ($P < 0.05$). **Conclusions** HIF- α , angiopoietin and VEGF are possible angiogenic factors in the angiogenesis in HCC. Tumor tissue hypoxia may be the initiating factor.

Key words: Hepatocellular Cancer/pathol; Angiopoietin; Hypoxia Inducible Factor; Vascular Growth Factor

CLC number: R730.261

Document code: A

收稿日期:2005-11-29; 修订日期:2006-05-30。

作者简介:袁玉峰,男,湖北红安人,武汉大学中南医院主治医师,主要从事肝脏外科的基础与临床方面的研究。

通讯作者:袁玉峰 电话:027-67812963; E-mail: yuanyf1971@163.com。

肿瘤的生长依赖于新生血管的形成,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体系统与血管形成密切相关。近来发现促血管生成素 angiopoietin, Ang)及其内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体(Tie2)系统是另一调节肿瘤血管生成的途径。本研究采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术和免疫组化方法检测了原发性肝癌、肝硬化及正常肝组织中 Ang2, HIF-1 α 及 VEGF mRNA 及蛋白的表达,并对其表达进行相关分析,以探讨三者在肝癌肿瘤血管生成中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及其资料收集

1.1.1 肝癌组 收集2002年9月—2005年3月本院手术切除的新鲜肝癌标本52例。迅速将标本放入液氮中冷冻,然后置-70℃冰箱保存。所有标本经常规病理学检查证实为肝细胞癌(HCC)。52例HCC中,男37例,女性15例;年龄26~67岁,平均(50.6 \pm 7.2)岁。

1.1.2 肝硬化组织组 14例。男11例,女性3例;年龄28~65岁,平均(49.4 \pm 6.8)岁。

1.1.3 外伤后切除的正常肝组织组 5例。男4例,女性1例;年龄23~59岁,平均(46.9 \pm 5.4)岁。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA的提取 半定量RT-PCR Trizol法提取RNA。所得RNA溶于无RNA酶的纯水中,用紫外分光光度计对其定量后分别进行RNA电泳和cDNA合成。2 μ L cDNA液加入20 μ L PCR体系中(该体系含2.5 μ L 10 \times PCR缓冲液,200 μ mol/L dATP, 200 μ mol/L dCTP, 200 μ mol/L dGTP, 200 μ mol/L dTTP, 50 pmol HIF-1 α , Ang2, VEGF和GAPDH引物,1U Taq酶)。然后经PCR扩增,条件为:95℃ 30 min, 56℃ 5 min, 72℃ 60 min,最后经72℃延长10 min。共30个循环。引物HIF-1 α , Ang2, VEGF和内参照GAPDH由上海生工公司合成。引物设计根据文献:HIF-1 α 基因引物为5-GAA ACC ACC TAT GAC CTG C-3和5-GTC GTG CTG AAT AAT ACC ACT C-3; Ang2基因引物为5-GAC GGC TGT GAT GAT AGA AAT AGG-3和5-GAC TGT AGT TGG ATG ATG TGC TTG-3; VEGF引

物为5-TTG CCT TGC TGC TCT ACC TC-3和5-TGC ATG GTG ATG TTG GAC TC-3;内参照GAPDH的引物为GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG和TCC GAC GCC TGC TTC ACC AC。扩增产物在2%琼脂糖凝胶电泳后,用JS-380自动凝胶图像分析仪对所获得的条带行半定量分析。

1.2.2 免疫组化 采用SP法,操作按说明书进行。以磷酸盐缓冲生理盐水溶液(PBS)置换一抗,其余步骤相同作为阴性对照。所用一抗均购自迈新公司。结果判断标准:阳性反应为棕黄色染色。光镜下按细胞显色有无及深浅记分:0为无色;1为浅色;2为深色。按显色细胞所占比例分1为1/2以下;2为1/2以上。上述两分值之乘积决定最终评分:阴性为0分(-);弱阳性为1~2分(+);强阳性为4分(++).以CD34标记微血管密度(MVD)。

1.3 统计学处理

定量资料多组间比较采用单因素方差分析;半定量等级资料的比较采用秩和检验;用Spearman等级相关检验分析组间相关性。

2 结果

2.1 RT-PCR结果

在肝癌组织和肝硬化组织中均可见Ang2, HIF-1 α 和VEGF阳性表达的条带,但肝癌组织中表达更明显,而正常肝组织则无明显表达(图1)。半定量分析表明Ang2, HIF-1 α 和VEGF mRNA的表达水平肝癌组和肝硬化组明显高于正常肝组织($P < 0.05$),但HCC组织和肝硬化组织中3指标的表达水平无统计学差异(表1)。Spearman等级相关分析显示:HCC中的Ang2 mRNA与HIF-1 α mRNA的表达水平呈正相关($r = 0.783$, $P < 0.01$);HIF-1 α mRNA与VEGFmRNA的表达水平呈正相关($r = 0.427$, $P < 0.05$),Ang2 mRNA与VEGFmRNA的表达水平亦呈正相关($r = 0.433$, $P < 0.05$)。

2.2 HCC组织中Ang2, HIF-1 α 和VEGF免疫组化结果

阴性对照均无阳性染色。Ang2阳性染色主要位于胞浆,HIF-1 α 阳性染色位于胞核和/或胞浆,VEGF阳性染色主要位于胞浆(图2a-d)。

表1 肝癌、肝硬化和正常肝组织中 Ang2, HIF-1 α 和 VEGFmRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

被检测组织	例数	HIF-1 α	Ang2	VEGF
肝癌	52	1.06 \pm 0.20 ¹⁾	1.32 \pm 0.21 ¹⁾	0.79 \pm 0.18 ¹⁾
肝硬化	14	0.93 \pm 0.10 ¹⁾	0.85 \pm 0.14 ¹⁾	0.72 \pm 0.11 ¹⁾
正常肝	5	0.28 \pm 0.05	0.31 \pm 0.07	0.26 \pm 0.05

注:与其正常肝组比, $P < 0.05$

1: 肝癌组织; 2: 肝硬化组织; 3: 正常肝组织

A: GAPDH; B: Ang2; C: HIF-1 α ; D: VEGF

图1 肝癌组织,肝硬化组织和正常肝组织中 Ang2, HIF-1 α , VEGF 的电泳图

a: Ang2

b: HIF-1 α

c: VEGF

d: CD34

图2 HCC 组织中 Ang2, HIF-1 α , VEGF, CD34 免疫组织化阳性染色 ($\times 40$)

HCC 组织中 Ang2, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的阳性表达率分别为 (41/52), (38/52), (45/52) 均明显高于肝硬化组织 (分别为 7/14, 7/14, 8/14) 和正常肝组织 (分别为 0/5, 0/5, 1/5) ($P < 0.05$)

(表2)。52 例 HCC 组织中, 36 例共表达 HIF-1 α , Ang2 和 VEGF 蛋白者, 其平均微血管数 (45.4 \pm 8.90) 个/HP, 明显高于非共表达组 (13.6 \pm 3.30) 个/HP ($P < 0.05$)。

表2 肝癌、肝硬化和正常肝组织中 Ang2, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达

被检测组织	例数	HIF-1 α			Ang2			VEGF		
		(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)
肝癌	52	14	16	22	11	17	24	9	17	28
肝硬化	14	7	5	2	7	4	3	6	3	5
正常肝	5	5	0	0	5	0	0	4	1	0

2.3 HCC 组织中 Ang2, HIF-1 α , VEGF 及 MVD 表达的相关性

Spearman 等级相关分析显示: HCC 中 Ang2 与 MVD 的表达呈高度正相关 ($r = 0.806, P < 0.05$); VEGF 与 MVD 的表达呈正相关 ($r = 0.512, P < 0.05$); HIF-1 α 与 MVD 的表达亦呈正相关 ($r = 0.472, P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明, 当肿瘤的体积超过 2mm³ 时, 若要继续生长必须依赖于新血管的生成^[1]。新生的血管不仅提供肿瘤生长所需的营养物质, 而且还利用其

作为转移的通道, 通过血液循环将原发癌细胞送至转移的靶器官。新生血管形成受到多种细胞因子的调节, VEGF 及其受体系统和 Ang 及其受体 Tie2 系统是调节肿瘤血管生成的两条重要途径^[2], 它们可能在肿瘤的发生、发展和转移过程中起重要作用^[3], 了解肿瘤新生血管形成的调控机制, 有助于寻找肿瘤治疗的新靶点^[4]。

HIF, VEGF 及其受体系统在肿瘤血管生成中的作用已有较多研究^[5-6], 而 Ang 是近来发现的与血管新生密切相关的家族。现已发现其中的 4 个成员, 即 Ang1, Ang2, Ang3 和 Ang4。研究较多的是 Ang1 和 Ang2。人类 Ang1 基因位于染色体 8q22.3

~23,其蛋白由498个氨基酸组成;它是血管稳定因子,能抑制肿瘤的生长和肿瘤血管的生成。Ang2基因位于染色体8p23.1,其蛋白由496个氨基酸组成,有一分泌信号肽,可启动肿瘤早期形成信号,促进肿瘤血管形成^[7-8]。

本研究运用半定量RT-PCR和免疫组化方法研究肝癌组织中Ang2, HIF-1 α , VEGF mRNA和蛋白的表达,发现肝癌组织中3指标的mRNA表达水平明显高于正常肝组织,而且它们之间的表达呈正相关;在共表达上述3种蛋白的肝癌组织中平均MVD明显高于阴性表达组。这些现象说明它们均直接或间接参与了肝癌新生血管的形成,而且三者之间存在着某种联系。Pichilue等^[9]体外实验已证实缺氧能够上调Ang2和VEGFmRNA的表达,VEGF亦能上调Ang2mRNA的表达。临床上常观察到肝癌组织内部存在缺血坏死区,这说明肿瘤组织存在着缺氧。根据Pichilue等体外实验结果和本实验结果,笔者推断,当肝癌生长到一定体积时(如 $>2\text{mm}^3$),肿瘤组织由于缺氧导致缺氧诱导因子的表达,然后诱导Ang2的表达;Ang2与内皮细胞Tie2受体特异性地结合,诱导内皮细胞分裂、移位,使新生血管呈非出芽式生长。当然这种方式生长的血管壁基质稀少,周边细胞样细胞缺如,胶原排列紊乱,故很不稳定,只有在延迟性升高的VEGF的作用下,内皮细胞发生迁移,增殖,才能形成新生血管^[10]。

本研究发现,Ang2, HIF-1 α 和VEGF与肝癌的新生血管形成有关,缺氧可能是这一复杂病理生理过程的起始环节。若针对这些作用靶点采取干预措施,将有助于寻找肝癌新的治疗途径。

参考文献:

- [1] O'Reilly MS, Holugrem L, Folkman J, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 315-328.
- [2] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF [J]. *Science*, 1999, 284(5422): 1994-1998.
- [3] 刘学强, 万恒荣, 陈海生, 等. 促血管生成素在原种植肝癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3): 196-198.
- [4] Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(9): 1231-1236.
- [5] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular specific growth factors and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 242-248.
- [6] Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(3): 293-299.
- [7] Loughna S, Sato TN. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development [J]. *Matrix Biology*, 2001, 20(5-6): 319-325.
- [8] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2, that disrupts in vivo angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 227(1): 55-60.
- [9] Pichilue P, Chavez JC, LaManna JC, *et al.* Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 279(13): 12171-12180.
- [10] Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin2 displays VEGF dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. [J] *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11205-11210.

本刊2007年各期重点内容安排

本刊2007年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第1期	乳腺、甲状腺外科	第7期	胆道外科
第2期	胆道外科	第8期	肝脏外科
第3期	肝脏外科	第9期	胃肠道外科
第4期	胃肠道外科	第10期	胰腺外科
第5期	胰腺外科	第11期	甲状腺、乳腺外科
第6期	血管、腔镜外科	第12期	其他